
Expresión inmunohistoquímica de p53 en individuos con liquen

Muiño A¹, Adler I¹, Lence A¹, Harada L¹, Nieto S²,
Denninghoff V^{2,3}, Avagnina A², Keszler A⁴, Lanfranchi H¹, Aguas S¹

¹Cátedra de Clínica Estomatológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires.

²Servicio de Anatomía Patológica del Centro de Educación Médica e Investigaciones Clínicas
"Norberto Quirno" (CEMIC).

³Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

⁴Cátedra de Anatomía Patológica de la Facultad de Odontología de la Universidad de Buenos Aires

Recibido 25/02/13

Aceptado 07/05/13

RESUMEN

Objetivo: Estimar el riesgo del potencial de malignización del liquen plano bucal analizando la expresión de la proteína p53.

Materiales y métodos: Se realizó un diseño de cohorte de sujetos con diagnóstico histopatológico de liquen. El desenlace fue el desarrollo de cáncer si/no. El total de individuos que cumplió con los criterios de inclusión/exclusión fue de 58. A los 58 sujetos se les realizó la determinación de p53.

Resultados: Cuarenta y nueve individuos mostraron una expresión de p53 menor al 5% con una $P > 0,05\%$ intrasujeto no transformado. En los 9 individuos transformados se observaron diferencias significativas entre la determinación pre y post de la proteína p53. El Riesgo Relativo fue de 188 con una significación estadística de $P < 0,01$.

Conclusion: La expresión de la proteína p53 en los individuos con liquen apoya la hipótesis que niveles superiores al 5% constituye un factor de incremento del riesgo en la transformación maligna de esta patología. Nuestros hallazgos deberían ser corroborados en el futuro con mayor número de individuos. La determinación de la p53 mediante IHQ en individuos con liquen plano bucal podría modificar el seguimiento clínico de estos individuos. Esto permitiría un diagnóstico precoz de cualquier alteración que pueda indicar un posible cambio hacia la malignización.

Palabras claves: liquen, plano bucal, p53, inmunohistoquímica, cohorte, riesgo

ABSTRACT

Objective: To determine the risk for potential malignant transformation of oral lichen planus by analyzing protein p53 expression.

Materials and methods: Cohort study of subjects with a histopathologic diagnosis of lichen. The study analyzed whether or not subjects developed cancer. A total of 58 subjects fulfilled the inclusion/exclusion criteria, and were analyzed for p53.

Results: Forty-nine (49) subjects showed a p53 expression $< 5\%$, with a $p > 0.05$ among subjects undergoing no transformation. In the 9 subjects undergoing malignant transformation, significant differences were observed between pre and post p53 expression. The relative risk was 188, with a statistical significance of $p < 0.01$.

Conclusions: Protein p53 expression in subjects with lichen supports the hypothesis that levels $> 5\%$ are associated with an increased risk of malignant transformation of this condition. Should our findings be proved in a larger series in the future, the clinical follow-up of these subjects could be modified. This would allow an early diagnosis of any disorder indicative of a potential malignant transformation.

Keywords: lichen, buccal planus, p53, immunohistochemistry, cohort, risk.

INTRODUCCIÓN

El liquen es una enfermedad inflamatoria crónica autoinmune que afecta las mucosas y la piel de etiología desconocida. Sus formas clínicas son reticulares y no reticulares (Eisen, 2005). Se presenta con mayor frecuencia en mujeres entre la 4ª y 6ª década de vida (Edwards and Kelsch, 2002; Lanfranchi-Tizeira et al., 2003). El diagnóstico se basa en los siguientes criterios clínicos: lesiones bilaterales y simétricas, patrón reticular, lesiones erosivas, atróficas, ampollares y queratósicas sólo en presencia de lesiones reticulares; e histopatológicos: infiltrado celular en banda confinado a la parte superficial del tejido conectivo, mayoritariamente linfocitario, signos de licuefacción degenerativa, ausencia de displasia epitelial (Van Der Meij and Van Der Waal, 2003). El primer reporte de esta patología se remontan al año 1910 y existen reportes que indican que el liquen puede dar origen a carcinomas orales (Eisen, 2002; Lanfranchi-Tizeira et al., 2003; Gandolfo et al., 2004; Mignogna et al., 2004; Xue et al., 2005; Sousa et al., 2008). Esta afirmación es controvertida, dado que algunos investigadores refieren que no se maligniza (Mattsson et al., 2002; Lodi et al., 2005).

El gen TP53 (también llamado P53; LFS1; TRP53; FLJ92943), mapea en el cromosoma 7p13.1. Este gen codifica para la proteína tumoral p53, la cual responde a diversos estreses celulares regulando genes blanco que inducen detención del ciclo celular, apoptosis, senescencia, reparación del DNA o cambios en el metabolismo. La p53 es expresada en bajos niveles en células normales y en altos niveles en una variedad de líneas celulares transformadas.

La proteína p53 es ubicua (se expresa en todos los tejidos). La p53 es una fosfoproteína formada por 393 aminoácidos y 3 dominios: un dominio de activación de factores de transcripción; un dominio que reconoce la secuencia específica del DNA (dominio central) y un dominio carboxilo-terminal (C-). El 80% de las mutaciones puntuales que se detectan en los cánceres humanos están localizadas en el dominio de unión a DNA de la proteína. La p53 activa las enzimas de reparación del DNA para corregir los daños detectados. Si el daño se repara

correctamente, p53 estimula la síntesis de Mdm2, activando su autodestrucción y la progresión en el ciclo celular. Si el daño no puede ser reparado, la célula puede entrar en apoptosis (muerte celular regulada genéticamente) o en senescencia (detención permanente del ciclo celular), ambos inducidos por p53. En resumen, p53 enlaza los procesos de daño en el DNA con reparación, detención en el ciclo celular y apoptosis. Es por ello que recibe el nombre de "guardián del genoma". Cuando una célula pierde la función de p53, el daño en el DNA no se repara, se acumula en las células hijas y éstas entran directamente en la ruta hacia la tumorigénesis (alrededor de un 50 % de todos los tumores humanos contienen mutaciones en p53), (Kumar et al., 2010). Es un gen frecuentemente mutado en los carcinomas orales, produciéndose una proteína alterada (Girod et al., 1994). El objetivo del trabajo es estimar el riesgo del potencial de malignización del liquen plano bucal analizando la expresión de la proteína p53.

MATERIALES Y MÉTODOS.

Se realizó un diseño de cohorte conformada por sujetos con liquen plano bucal que consultaron entre 1997 y 2004 a partir del desenlace cáncer si/cáncer no. Entre 1997 y 2009 concurren a la consulta 884 sujetos con diagnóstico clínico de Liquefación plano bucal.

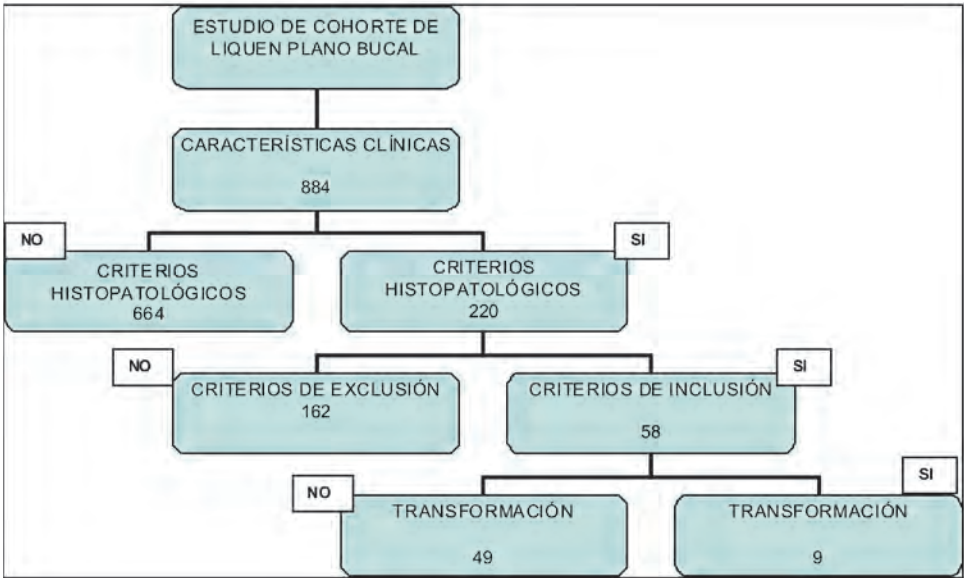
Los criterios de inclusión para el protocolo fueron sujetos mayores de 21 años, con 5 años de seguimiento (con 2 o mas estudios histopatológicos durante su seguimiento); con diagnóstico clínico de liquen (lesiones bilaterales y simétricas con patrón reticular; lesiones erosivas, atróficas, ampollares y queratósicas, sólo en presencia de lesiones reticulares); y con diagnóstico histopatológico (infiltrado celular en banda confinado a la parte superficial del tejido conectivo, mayoritariamente linfocitario con signos de licuefacción degenerativa y ausencia de displasia epitelial), (Van Der Meij E and van Der Waal, 2003). Los criterios de exclusión fueron individuos que no firmaron el consentimiento

informado firmado acorde con la declaración de Helsinki para participar del protocolo; menores de 21 años; seguimiento menor a 5 años; sujetos sin diagnóstico histopatológico de liquen; sujetos con liquen y displasia o cáncer en forma simultánea; e individuos que hayan desarrollado cáncer bucal en menos de 6 meses posteriores a la primera consulta (Algoritmo cohorte). A las muestras histopatológicas de los 58 individuos, se les efectuó la inmunomarcación de la proteína p53. Se trabajó con muestras fijadas en formol buffer e incluidas en parafina. Del taco se realizaron cortes de 4-5 micrones para hematoxilina-eosina (HE) y de 3-4 micrones para inmunohistoquímica (IHQ) con el antisuero anti-p53, clon Bp53.12 (Zymed, Laboratories, Invitrogen, CA 9480 South San Francisco). El tejido se montó sobre portaobjetos previamente sylanizados y se procedió a la deshidratación en forma graduada de etanol. Se realizó el bloqueo de peroxidasa endógena, mediante una solución inhibidora de alcohol metílico y agua oxigenada de 30 volúmenes, durante 20 minutos. Cumplido este tiempo se efectuó la recuperación antigénica en un horno a microondas, utilizando ácido cítrico pH=6 durante 15 minutos, a potencia máxima y 15 minutos a potencia 50%. Una vez alcanzado el enfriamiento de la solución los cortes se enjuagaron con agua destilada y se colocaron en solución de PBS (phosphate buffer saline), para luego aplicar durante 30 minutos, el suero normal de caballo (kit de detección PK 7800-Vector Laboratories Inc-Burligame, CA 94010, USA). Transcurrido el tiempo se incubó con el antisuero primario correspondiente por el término de 2 horas, en cámara húmeda. Se lavó en PBS/Tritón, para colocar durante 30 minutos, en secundario biotilado (kit de detección PK 7800-Vector Laboratories Inc-Burligame, CA 94010, USA), se repitieron los lavados para colocar el complejo ABC durante 30 minutos. Se reveló poniendo en manifiesto la reacción antígeno-anticuerpo, empleando el cromógeno diaminobencidina (DAB) y hematoxilina suave virada en carbonato de litio como contraste. Se deshidrataron, aclararon y montaron los preparados. La expresión de p53 mediante IHQ fue exclusivamente nuclear. Se valoró en cuatro grados: negativa (0%), positiva débil (hasta 5%),

positiva moderada (hasta 25%), positiva intensa (hasta 50%). Finalmente se establecieron 2 grupos: de “baja expresión” (<5%) y de “alta expresión” (>5%).

RESULTADOS

La cohorte quedó constituida por 58 individuos que tenían 2 o mas estudios histopatológicos durante su seguimiento. Las formas que prevalecieron fueron erosivo-atrófico (26.7%) y queratósico. (22.2%). La localización más frecuente fue la lengua y mucosa yugal. El 76% de la cohorte fue de sexo femenino, el 24% de sexo masculino. La edad media fue de 63.74 años. No hubo diferencias en la edad media entre ambos sexos (Tabla 1). La media del seguimiento fue de 7.8 años con un rango comprendido entre 5 y 12 años. De los 58 individuos, 49 (84%) no sufrieron transformación y 9 (12%) se transformaron en cáncer. Pudimos observar que los 49 sujetos no transformados mostraron en la biopsia previa una IHQ con un valor entre el 0% y el 5%. La IHQ en la biopsia posterior tuvo un valor entre 1% y 5%. La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon mostró diferencias no significativas (0.180). En la biopsia previa la IHQ de los individuos transformados estuvo comprendida entre 5% y 20% y la inmunomarcación en la biopsia posterior tuvo un valor entre el 10% y el 45%. La prueba de los rangos con signo de Wilcoxon mostró diferencias significativas (0.007). Nosotros observamos que en la biopsia previa de la población que se transformó el 89% (8/9) tenía una p53 mayor al 5%, mientras que en los no transformados el 94% presentaba una p53 menor al 5%, (Tabla 2). Por consiguiente para evaluar el riesgo se considero, como valor de corte, al 5%, teniendo en cuenta que valores superiores podrían constituir un factor de riesgo en la transformación maligna del liquen. Observamos un Riesgo Relativo (RR) de 188 con un Intervalo de Confianza (IC 0.95): 15,20-2324,40, con diferencias significativas X²: 32,61 p< 0.001 (con corrección de Yates), (Tabla 3, Fig. 1, 2, 3 y 4)



La cohorte quedó constituida por 58 individuos que tenían 2 o más estudios histopatológicos durante su seguimiento.

Algoritmo cohorte de líquen plano oral.

	SEXO FEMENINO Nº 44	SEXO MASCULINO Nº 14	TOTAL Nº 58
EDADES MEDIA /ES MEDIANA MOD0	33-87 64.09±1,71 66 69	43-82 62.64±2,98 61 61	33-87 63,74±1,47 64 58
(%)	76	24	100

Tabla 1. El 76% de la cohorte corresponde al sexo femenino y el 24% al sexo masculino

	NO TRANSFORMADOS Nº 49		TRANSFORMADOS Nº 9	
P53	1º BIOPSIA	2º BIOPSIA	1º BIOPSIA	2º BIOPSIA
0%	20 (40%)	18 (36%)		
1-5%	29 (60%)	29 (60%)	1 (11%)	1 (11%)
6-10%		2 (4%)	5 (55%)	
11-20%			3 (34%)	3 (34%)
21-45%				5 (55%)

El 89% de la población que se transformó, tenía un p53 mayor al 5%, mientras que en los no transformados 96%, presentaba una p53 comprendida entre el 0 y el 5%.

Tabla 2: Análisis resultados de la p53 mediante inmunohistoquímica en los 58 individuos.

	NO TRANSFORMADOS	TRANSFORMADOS	TOTAL
	49	9	58
p53 <5%	47	1	48
p53 >5%	2	8	10

Riesgo Relativo (RR): 188; Intervalo de Confianza (IC: 0.95): 15,20-.2324,40; X²: 32,61 p< 0.001 (con corrección de Yates). Valores superiores al 5% mediante inmunomarcación de p53 incrementa el riesgo de malignización al obtener un Riesgo Relativo igual a 188.

Tabla 3. Outcome test de p53 en pacientes con Liquen

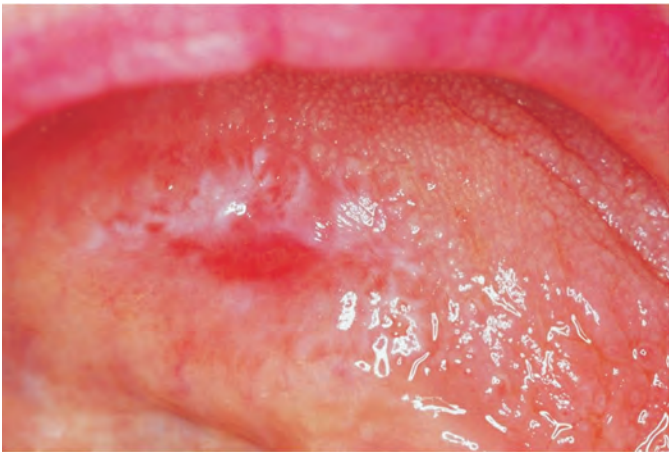


Figura 1. Observamos en el borde de la lengua atrofia y estrías de Wickham. La paciente presentaba dichas estrías en ambas mucosas yugales, su primer consulta fue en 2002. Antecedentes a destacar: hipertensión e hipercolesterolemia. Madre fallecida por cáncer gastrointestinal.

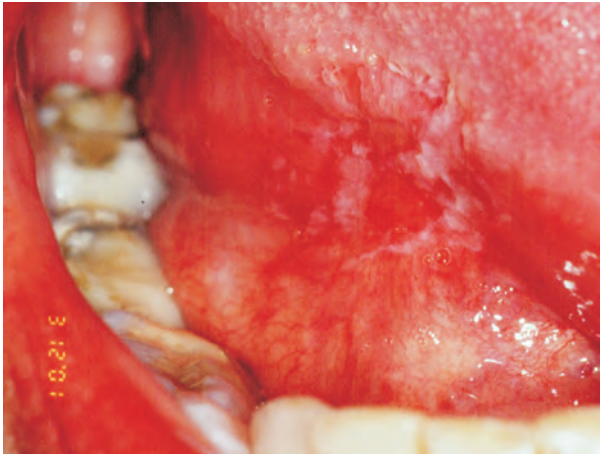


Figura 3. En el borde de la lengua, involucrando cara ventral, se visualiza erosión circunscripta por estrías de Wickham. La paciente en el año 2005 discontinúa sus controles, concurriendo en 2006, donde se le realiza una biopsia con su respectivo estudio histopatológico: Ca. Escamoso Grado II

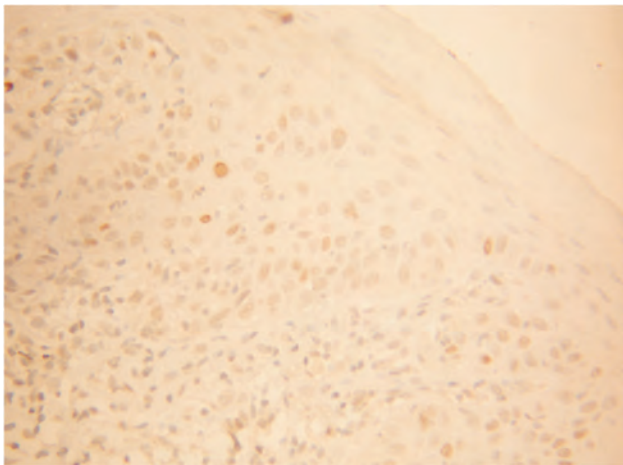


Figura 2. Inmunomarcación p53 10%, realizada en el año 2002.

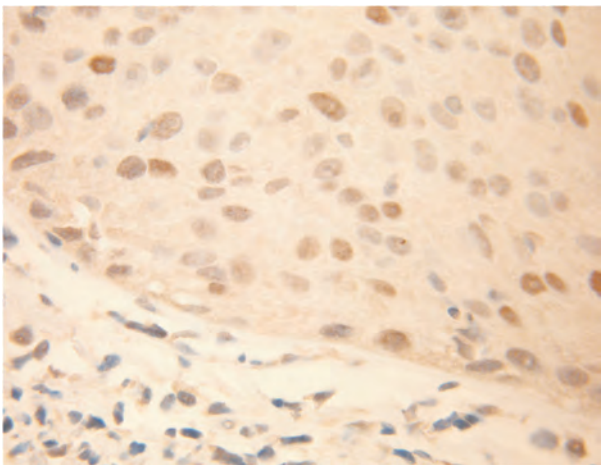


Figura 4. Inmunomarcación p53 30% realizada en el año 2006.

DISCUSIÓN

Desde hace algunos años existen estudios que refieren al potencial maligno del liquen plano bucal y del mayor riesgo que tienen estos sujetos para desarrollar cáncer oral. Este concepto tiene una aceptación generalizada y el liquen plano es clasificado entre las condiciones precancerosas (OMS) y no como lesión precancerosa. De todos modos, aunque existan controversias, no se puede ignorar la evidencia clínica de un incremento en el desarrollo del cáncer a partir del liquen plano (Mignona et al., 2004). En el proceso de carcinogénesis debe existir activación de los protooncogenes que promueven el crecimiento celular y pérdida de la función de los genes supresores que inhiben la proliferación celular. El oncogén TP53, que regula el ciclo celular, es el responsable del mantenimiento de la integridad del genoma. La activación del p53, después del daño del DNA, es un importante mecanismo protector celular, que facilita la reparación del DNA y estimula la apoptosis de las células condenadas. La pérdida funcional y la expresión alterada de p53 es uno de los cambios genéticos más frecuentes en el cáncer humano y juega un rol en los estadios tempranos de la carcinogénesis (Lee et al., 2005). En nuestro estudio de cohorte, los individuos con liquen plano bucal, registraron las siguientes formas clínicas prevalentes: erosivas, atróficas y queratósicas. Lee y colaboradores (Department of Oral and Máxilofacial Surgery, Nacional Taiwan University Hospital) estudió 56 individuos con liquen de los cuales 37/56 (66%) eran formas atróficas. Es de destacar que considera como liquen atrófico las formas ampollares y erosivas (Lee et al., 2005). Estos resultados son similares a los obtenidos en nuestro trabajo. Los individuos incluidos en nuestro protocolo debían tener un mínimo de 5 años de seguimiento, la media del mismo, resultó igual a 7.8 años. El radio de transformación maligna por año fue de 1.92. Salem y colaboradores, en Arabia Saudita, al estudiar 4277 individuos con diversas patologías orales, incluyeron 72 individuos con liquen plano bucal con un seguimiento medio de 3.2 años y un porcentaje de transformación de 5.6%, siendo el

radio de transformación por año igual a 1.74% coincidiendo con nuestros resultados (Salem, 1989). Un porcentaje de transformación maligna de 5.32% (14/263) fue reportado por Lo Muzzio y colaboradores en 1998 en Italia, con un seguimiento medio de 5.7 años y un radio de transformación maligna por año igual 0.93 (Lo Muzzio et al., 1998). De los 58 pacientes que presentaban 2 o más estudios histopatológicos con diagnóstico de liquen plano bucal 9/58 (15%) se transformaron en carcinoma de células escamosas. La inmunomarcación en estos pacientes, en sus biopsias iniciales, mostraron valores de P53 comprendidos entre el 1% y 20% y la inmunomarcación de las biopsias posteriores durante el seguimiento revelaron un valor de p 53 comprendido entre un 5% y un 45%. El análisis del estudio intrasujeto mostró diferencias significativas en el grupo de los pacientes transformados (prueba de los rangos con signo de Wilcoxon : 0,007). Los estudios realizados hasta el momento con el fin de asociar el potencial de malignización del liquen y la expresión de la proteína P53, han sido realizados con diseños de casos y controles, donde la selección del control se constituye en un sesgo al evaluar esta asociación en la evolución al cáncer oral. (Lee, et al. 2005, Sousa, et al. 2009).

Giroud y colaboradores en el año 1993 reportaron la positividad de la proteína p53 en preparados de liquen plano sin displasia y sugirieron que la proteína p53 mutada incrementaba el riesgo de la transformación maligna del liquen, indicando que la mutación del gen podría estar asociada a atipías no observables al microscopio (Giroud et al., 1993). Sousa y colaboradores (Department of Oral Pathology, São José dos Campos Dental School, São Paulo State University, São Paulo, Brazil) analizaron el potencial de transformación maligna del liquen plano bucal y la displasia epitelial. Para ello estudiaron 24 muestras con diagnóstico histopatológico de liquen plano y un número similar de muestras con diagnóstico histopatológico de displasia epitelial. Los resultados obtenidos mostraron una sobreexpresión de la proteína p53 en 10/24 (41.67%) muestras estudiados por IHQ con

diagnóstico liquen. Igual resultado reportaron en 10/24 (41.67%) de las muestras con displasia epitelial, concluyendo que el liquen plano, presentaba una posibilidad de transformación maligna similar a la displasia epitelial, y que esta no es consecuencia de un error en el diagnóstico inicial (Sousa et al., 2009). La observación de nuestro estudio, mostró una sobreexpresión de la proteína p53 mayor al 5% en el 89% de las biopsias al momento del diagnóstico, en la población que se transformó. Mientras que en los no transformados la sobreexpresión de la proteína estuvo comprendida entre el 0% y 5%. No existiendo trabajos publicados que analicen el riesgo de malignización a partir de un valor de corte de la sobreexpresión de la proteína p53, nosotros creemos, dado los resultados observados, que valores superiores al 5% mediante inmunomarcación incrementa el riesgo de malignización al obtener un Riesgo Relativo igual a 188. Sin embargo nuestro Intervalo de Confianza (IC 0.95: 15,20-2324,40) nos advierte sobre la necesidad de aumentar la población en estudio.

Este es el primer estudio del liquen plano mediante técnicas histológicas de rutina (HE e IHQ) en una población de la Argentina. Los resultados de nuestro estudio sobre la alteración observada en la expresión de la proteína p53 en los individuos con liquen apoyan la hipótesis que niveles superiores al 5% mediante IHQ constituyen un factor de incremento del riesgo en la transformación maligna de esta patología. Este trabajo es un generador de hipótesis. Nuestros hallazgos deberían ser corroborados en el futuro con mayor número de individuos. La determinación de la p53 mediante IHQ en individuos con liquen plano bucal podría modificar el seguimiento clínico de estos individuos. Esto permitiría un diagnóstico precoz de cualquier alteración que pueda indicar un posible cambio hacia la malignización.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se llevó a cabo con el Subsidio Programa de Apoyo a la Investigación

Clínica de la Facultad de Odontología de la UBA "Profesor Rodolfo Erausquín".

BIBLIOGRAFÍA

Edwards P, Kelsch R. Oral lichen planus: Clinical presentation and management. *J Can Dent Assoc* (2002). 68:494-499.

Eisen D, Carrozzo M, Sebastian J, Thongprasom K. Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis* 11: (2005) 338-349.

Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol* (2002) 46:207-214.

Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M, Broccoletti R, Carbone M, Pagano M. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol* (2004) 40:77-83.

Girod S, Kramer C, Knufermann R, Krueger G. p53 expression in the carcinogenesis in the oral mucosa. *J Cell Biochem* (1994) 56:444-448.

Girod SC, Krueger G, Pape HD. p53 and Ki 67 expression in preneoplastic and neoplastic lesions of the oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* (1993) 22:285-288.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC Robbins and Cotran *Pathologic Basis of Disease*, 8th Edition. Saunders Elsevier: (2010). Philadelphia.

Lanfranchi-Tizeira H, Aguas S, Sano S. Transformación maligna del Líquen Plano Bucal atípico: Análisis de 32 casos. *Med Oral* (2003). 8:2-9.

Lee J, Kuo M, Cheng S, Chiang C, Jeng J, Chang H. Higher expressions of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atrophic oral lichen planus and patients with areca quid chewing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (2005) 99:471-478.

Lo Muzio L, Mignogna MD, Favia G, Procaccini M,

Testa NF, Bucci E. The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. *Oral Oncol* (1998) 34:239-246.

Lodi G, Scully C, Carrozzzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* (2005) 100:164-178.

Mattsson U, Jontell M, Holmstrup P. Oral lichen planus and malignant transformation: is a recall of patients justified? *Crit Rev Oral Biol Med* (2002) 13:390-396.

Mignogna M, Fedele S, Lo Russo L, Lo Muzio L, Bucci E. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence?. *Oral Oncol* (2004) 40:120-130

Salem G. Oral lichen planus among 4277 patients from Gizan, Saudi Arabia. *Community Dent Oral Epidemiol* (1989) 17:322-324.

Sousa F, Paradella T, Carvalho Y., Rosa L (2009). Immunohistochemical expression of PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. *J Oral Sci* (2009) 51:117-121.

Sousa FA, Rosa LE (2008). Oral lichen planus: clinical and histopathological considerations. *Braz J Otorhinolaryngol* (2008) 74:284-292.

van Der Meij E, Van Der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med* (2003) 32:507-512.

Xue JL, Fan MW, Wang SZ, Chen XM, Li Y, Wang L. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *J Oral Pathol Med* (2005) 34:467-472.

Dirección para correspondencia:
Facultad de Odontología, Universidad de Buenos Aires.
Hospital Odontológico Universitario.
M. T. de Alvear 2142. Piso 5 Sector A. (CP 1125) CABA
Email: pcbd@odon.uba.ar